

5
AF

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 11-092399

(43) Date of publication of application : 06.04.1999

(51) Int.CI. A61K 39/395

// C12N 15/02

C12P 21/08

(21) Application number : 09-274960 (71) Applicant : CHUGAI PHARMACEUT CO LTD

(22) Date of filing : 24.09.1997 (72) Inventor : KOISHIHARA YASUO
YOSHIMURA YASUSHI

(54) MYELOMA MEDICINE

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject medicine capable of exhibiting an excellent cell-damaging activity against myeloma cells by including an antibody specifically acting on a protein having a specific amino acid sequence.

SOLUTION: This myeloma medicine contains as an active ingredient an antibody (preferably a monoclonal antibody) that specifically binds to (A1) a protein having (A') an amino acid sequence of the formula or (A2) a protein comprising the protein A1 in which one or more (e.g. one to several) amino acids are substituted, deleted or inserted and which has a pre cell B proliferation-supporting ability, and further that has an activity to damage cells such as antibody-dependent cellular cells. The medicine is preferably administered at a dose of 0.01-100 mg/kg body as the active ingredient by a parenteral administration method such as an intravenous, intramuscular, intraabdominal or hypodermic injection method.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.07.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

AF

特開平11-92399

(43)公開日 平成11年(1999)4月6日

(51)Int.Cl.⁶
A 6 1 K 39/395
// C 1 2 N 15/02
C 1 2 P 21/08

識別記号
ADU

F I
A 6 1 K 39/395
C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 15/00

ADUN
C

審査請求 未請求 請求項の数 5 FD (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平9-274960

(22)出願日 平成9年(1997)9月24日

(71)出願人 000003311

中外製薬株式会社
東京都北区浮間5丁目5番1号

(72)発明者 小石原 保夫
静岡県御殿場市駒門1-135 中外製薬株式会社内

(72)発明者 吉村 康史
静岡県御殿場市駒門1-135 中外製薬株式会社内

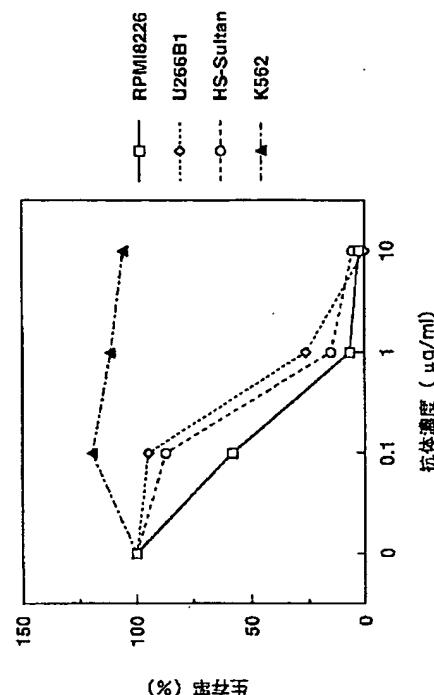
(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

(54)【発明の名称】骨髄腫治療剤

(57)【要約】

【課題】新規な骨髄腫治療剤の提供。

【解決手段】配列番号: 1に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質、又は配列番号: 1において1又は複数個のアミノ酸の置換、欠失及び/又は挿入により修飾されたアミノ酸配列を有し、且つプレB細胞増殖支持能を有するタンパク質に対して特異的に結合するタンパク質に特異的に結合する抗体を有効成分として含む骨髄腫治療剤。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する骨髓腫治療剤。

【請求項2】 配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合し、かつ、細胞障害活性を有する抗体を有効成分として含有する骨髓腫治療剤。

【請求項3】 抗体が、モノクローナル抗体である請求項1又は2記載の骨髓腫治療剤。

【請求項4】 細胞障害活性が、ADCC活性またはCDC活性である請求項2又は3記載の骨髓腫治療剤。

【請求項5】 配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1～複数個のアミノ酸が置換、欠失及び／又は挿入されたアミノ酸配列を有し、タンパク質かつ、プレB細胞増殖支持能を有するタンパク質に特異的に結合する抗体を有効成分とする請求項1～4のいずれか1項記載の骨髓腫治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するBST-2蛋白質に特異的に結合する抗体を有効成分として含有する骨髓腫治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】生体には、外因性の微生物あるいは異物などから個体を防御するための機構、すなわち免疫機構が複雑に存在している。免疫機構の中で大きな役割を担っているB細胞は、造血幹細胞が骨髓中で種々のサイトカイン等の刺激によりプロB細胞、プレB細胞を経て成熟B細胞に分化し、さらに抗原刺激により活性化され、最終的に抗体を産生分泌する形質細胞になる。このB細胞の分化・増殖には骨髓中のストローマ細胞（支持細胞）が深く関与していることが知られている。すなわち、B細胞と骨髓ストローマ細胞との直接的な接着がB細胞の分化・増殖に深く関与していることが報告されている（Miyake, K. et al., J. Exp. Med., (1991) 173, 599-607）。

【0003】骨髓腫は、免疫グロブリンを産生分泌する形質細胞（骨髓腫細胞）が、主として骨髓中でモノクローナルに増加する腫瘍性疾患であり、血清中あるいは尿中にモノクローナルな免疫グロブリンもしくはその構成成分であるI鎖、H鎖などが検出される（小坂昌明ら、日本臨床（1995）53, 91-99）。骨髓腫は、B細胞の最終分化段階である形質細胞がモノクローナルに増殖する疾患であることから、骨髓腫細胞の増殖にも正常B細胞同様、骨髓ストローマ細胞との相互作用が関与していると考えられる。この骨髓腫細胞と骨髓ストローマ細胞との接着にはCD21、VLA-5およびMPC-1といった接着因子が関与していると考えられているが（河野道生、臨床科学（1996）32, 703-710）、その他の因子については現在も研究が進められている。

【0004】一方、石川らはリウマチ患者滑膜細胞をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体（RS38、RS38-E）を報告している（Ishikawa, J. et al., GENOMIC S (1995) 26, 527-534）。石川らは、本抗体を用い、本抗体が認識する抗原BST-2を単離・同定した（Ishikawa, J. et al., GENOMICS (1995) 26, 527-534）。さらに、石川らは、本論文中でBST-2が骨髓ストローマ細胞上に発現していること、また、BST-2が骨髓中でのプレB細胞の増殖に関与している可能性があることを述べている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】近年、骨髓腫の治療に種々の化学療法やインターフェロン療法などが用いられるようになった結果、一時的抗腫瘍効果はかなりの上昇が見られているものの、骨髓腫患者の生存期間については依然30-40カ月とここ数十年ほとんど進歩が見られていない。従って、骨髓腫を寛解に導き、患者の生存期間を延長するような画期的な治療剤あるいは治療法が待たれている。本発明の目的は、骨髓腫に対する新しい治療剤を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、所期の目的を達成すべく、BST-2プローブを用いたノザンプロット解析、あるいは抗BST-2抗体を用いて、FCM（フローサイトメトリー）解析、CDC活性のような細胞障害活性の測定等のイン・ビトロでの研究を重ねた結果、骨髓腫細胞において、BST-2が遺伝子およびタンパクのレベルで強く発現していること、また、抗BST-2抗体が骨髓腫細胞に対し細胞障害活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】したがって、本発明は配列番号1に示されるアミノ酸配列又はこのアミノ酸配列に対して修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、好ましくは細胞障害活性を有する抗体を有効成分として含有する、骨髓腫治療剤を提供する。前記抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。また、細胞障害活性としてADCC活性またはCDC活性が挙げられる。前記の修飾されたアミノ酸配列とは、配列番号：1のアミノ酸配列に対して、1以上、例えば1～数個のアミノ酸の置換、欠失及び／又は挿入により修飾されており、且つプレB細胞増殖支持能を有するアミノ酸配列を意味する。

【0008】

【発明の実施の形態】

1. 抗体の作製

1-1. ハイブリドーマの作製

本発明で使用される抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、BST-2蛋白質やBST-2を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法

によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0009】具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原であるBST-2 発現細胞としては、リウマチ患者滑膜細胞由来であるSynSV6-14 (Ishikawa, J. et al., GEN OMICS (1995) 26, 527-534) を用いることができる。また、感作抗原として配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいは抗BST-2 抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを使用することができる。

【0010】なお、感作抗原として使用される、配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質のcDNAはpUC19ベクターのXbaI切断部位に間に挿入されて、プラスミドpRS38-pUC19として調製されている。このプラスミドpRS38-pUC19を含む大腸菌 (E.coli) は、平成5年(1993年)10月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に、Escherichia coli DH5a (pRS38-pUC19) として、受託番号FERM BP-4434としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている(特開平7-196694参照)。このプラスミドpRS38-pUC19に含まれるcDNA断片を用いて遺伝子工学的手法により、抗BST-2 抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを作製することができる。

【0011】感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的な方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

【0012】このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550)、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell

(1976) 8: 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276:269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133) 等が適宜使用される。

【0013】前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレンギリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0014】免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適な RPMI 1640培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、ウシ胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37°C程度に加温したPEG 溶液、例えば、平均分子量1000~6000程度のPEG 溶液を通常、30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

【0015】当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノプロテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。当該HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間、通常数日~数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび单一クローニングが行われる。

【0016】また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* でBST-2 またはBST-2 発現細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、BST-2 またはBST-2 発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる(特公平1-59878 参照)。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランシスジェニック動物に抗原となるBST-2 またはBST-2 発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取

得してもよい(国際特許出願公開番号WO 93/12227、WO 92/03918、WO94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735 参照)。

【0017】このようにして作製されるモノクローナル抗体を产生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0018】具体的には、抗BST-2 抗体産生ハイブリドーマの作製は、Ishikawa, J. らの方法 (Ishikawa, J. et al., GENOMICS (1995) 26, 527-534) により行うことができる。抗BST-2 抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウス(日本クレア製)の腹腔内に注入して腹水を得、この腹水から抗BST-2 抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5% BM-Condimed H1 (Boehringer Mannheim 製) 含有RPMI 1640培地、ハイブリドーマSFM 培地 (GIBCO-BRL製)、PFH M-II 培地 (GIBCO-BRL 製) 等で培養し、その培養上清から抗BST-2 抗体を精製する方法で行うことができる。

【0019】1-2. 組換え型抗体

本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて产生させた組換え型抗体を用いることができる(例えば、Carl A. K. Borrebaeck, James, W. Lerrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照)。

【0020】具体的には、目的とする抗体を产生するハイブリドーマから、抗体の可変(V)領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. ら、Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法 (Chmuczynski, P. ら、(1987) 162, 156-159) 等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) 等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

【0021】得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit 等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDERRACE Kit (Clontech製) やおよびPCRを用いた5'-RACE法 (Frohman, M. A. ら、Pr

oc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002 ; Beilavsky, A. ら、Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) を使用することができる。得られたPCR 産物から目的とするDNA 断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNA の塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

【0022】目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

【0023】1-3. 発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター/エンハンサー(human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)を挙げることができる。

【0024】また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター/エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40(SV 40)等のウィルスプロモーター/エンハンサーやヒトエリシングションファクター-1 α (HEF1 α)などの哺乳類細胞由来のプロモーター/エンハンサーを用いればよい。例えば、SV 40 プロモーター/エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法(Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 α プロモーター/エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法(Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)に従えば容易に実施することができる。

【0025】大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法(Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法(Science (1988) 240, 1041-1043)に従えばよい。抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに產生さ

せる場合、pe1Bシグナル配列 (Lei, S. P. et al. J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。ペリプラズムに產生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、WO96/30394を参照)。

【0026】複製起源としては、SV 40、ポリオーマウイルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドランスマーカー (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアミニホスホリボシルランスマーカー (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。本発明で使用される抗体の製造のために、任意の產生系を使用することができる。抗体製造のための產生系は、*in vitro* および *in vivo* の產生系がある。*in vitro* の產生系としては、真核細胞を使用する產生系や原核細胞を使用する產生系が挙げられる。

【0027】真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる產生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5 などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (Nicotiana) 属、例えばニコティアナ・タバコ (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。

【0028】原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる產生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、ウシ胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、*in vivo* にて抗体を產生してもよい。

【0029】一方、*in vivo* の產生系としては、動物を使用する產生系や植物を使用する產生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる產生系がある。哺乳類動物としては、ヤギを用いることができる。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。

る。植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

【0030】これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を產生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に產生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が產生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから產生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0031】また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば *Nicotiana tabacum* に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0032】上述のように、本発明でいう「宿主」には、これら *in vitro* の產生系における細胞や *in vivo* の產生系における動物、植物も包含される。*in vitro* または *in vivo* の產生系にて抗体を產生する場合、抗体重鎖 (H鎖) または軽鎖 (L鎖) をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを单一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号WO 94-11523 参照)。

【0033】上述のように得られた抗体は、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合させ抗体修飾物として使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

【0034】2. 抗体の分離、精製

2-1. 抗体の分離、精製

前記のように產生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティーコロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティーコロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラム、抗体結合カラム

ムが挙げられる。プロテインAカラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、POROS、Sephadex G-25等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティクロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外沪過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。

【0035】かくして得られる本発明の抗体は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、或いは、該アミノ酸配列において1～複数、通常、1ないし数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入されたタンパク質で、かつ、プレB細胞増殖支持能を有するタンパク質に特異的に結合する。また、本発明においては、好ましくは、細胞障害活性を有する抗体が使用される。

【0036】2-2. 抗体の濃度測定

2-1 で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定またはELISA等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、本発明で使用される抗体または抗体を含むサンプルをPBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/mlを1.35 ODとして算出する。また、ELISAによる場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M 重炭酸緩衝液(pH9.6)で1 μ g/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100 μ lを96穴プレート(Nunc製)に加え、4°Cで一晩インキュベーションし、抗体を固層化する。

【0037】ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体または抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL製) 100 μ lを添加し、室温にて1時間インキュベーションする。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフィオスマーカーゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100 μ lを加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nmでの吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

【0038】3. FCM 解析

骨髄腫細胞と本発明で使用される抗体との反応性は、FCM (フローサイトメトリー) 解析で行うことができる。細胞としては、樹立細胞株あるいは新鮮分離細胞を用いることができる。例えば樹立細胞株として、多発性骨髄腫由来KPMM2 (特開平7-236475)、多発性骨髄腫由来RPMI8226 (ATCC CCL-155)、IgE型骨髄腫由来U266B1 (ATCC TIB-196)、IgG型多発性骨髄腫由来HS-Sultan (ATCC CRL-1484)、形質細胞腫由来ARH-77 (ATCC CRL-1621)、慢性骨髄性白血病由来K562 (ATCC CCL-243)など各々1.0 \times 10⁷ 個をPBS(-)で洗浄した後、TRIzol (GIBCO-BRL 製) 1 mlを加え溶解する。これにクロロホルム200 μ lを加え、搅拌後冷却高速遠心機MRX-152 (トミー精工製) を用いて14000 rpmで15分間遠心し、上層を回収する。

【0039】上記細胞をPBS(-)で洗浄した後、FACS 緩衝液(2%ウシ胎児血清、0.05%アジ化ナトリウム含有PBS(-))で25 μ g/mlに希釈した抗体あるいはコントロール抗体 100 μ lを加え、氷温化30分インキュベートする。FACS 緩衝液で洗浄した後、25 μ g/mlのFITC標識ヤギ抗マウス抗体 (GAM, Becton Dickinson 製) 100 μ lを加え、氷温化30分間インキュベートする。FACS 緩衝液で洗浄した後、600 μ lのFACS 緩衝液に懸濁し、FACScan (Becton Dickinson製) で各細胞の蛍光強度を測定すればよい。

【0040】4. ノサンプロット

骨髄腫細胞内のBST-2のmRNAの発現の強弱は、ノサンプロット解析により測定することができる。実際には、以下のようにして行うことができる。すなわち、骨髄腫細胞株として、例えば多発性骨髄腫由来KPMM2 (特開平7-236475)、多発性骨髄腫由来RPMI8226 (ATCC CCL-155)、IgE型骨髄腫由来U266B1 (ATCC TIB-196)、IgG型多発性骨髄腫由来HS-Sultan (ATCC CRL-1484)、形質細胞腫由来ARH-77 (ATCC CRL-1621)、慢性骨髄性白血病由来K562 (ATCC CCL-243)など各々1.0 \times 10⁷ 個をPBS(-)で洗浄した後、TRIzol (GIBCO-BRL 製) 1 mlを加え溶解する。これにクロロホルム200 μ lを加え、搅拌後冷却高速遠心機MRX-152 (トミー精工製) を用いて14000 rpmで15分間遠心し、上層を回収する。

【0041】これにイソプロパノール500 μ lを加え、軽く搅拌後同様に15000 rpmで10分間遠心した後、沈殿を70%エタノールで洗浄する。減圧乾燥後、DEPC処理水に溶解させ、全RNAを得る。RNA濃度については、一部をさらにDEPC処理水で希釈し波長260 nmの吸光度をスペクトロフォトメーターDU 650 (BECKMAN 製) を用いて測定し、算出することができる。このようにして得た全RNAを、20 μ g/レーンとなるようにホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルにアプライし、100Vにて電気泳動を行う。電気泳動後、アガロースゲルからRNAをナイロンメンブランハイボンドN (Amersham製) にキャピラリートランスファーにより転写する。

【0042】転写後、ナイロンメンブランをRapid Hybridization buffer (Amersham製) で68°Cで15分間プレハイブリダイゼイションした後、BST-2抗原cDNAをクローニングしたプラスミドpUC-HM(315)のHind III断片(315bp)またはEcoR I-Not I断片(約900bp)を鋳型としてrandom prime DNA labelling system (Amersham製)により³²P標識したプローブDNAを加え、68°Cで2時間ハイブリダイゼイションする。ナイロンメンブランを0.1%SDS含有2x SSC溶液、0.1%SDS含有0.2x SSC溶液でそれぞれ2回ずつ洗浄した後、BAS-5000 (富士フィルム製)にてBST-2 mRNAの検出を行うことができる。

【0043】5. 細胞障害活性

5-1. CDC活性の測定

本発明に使用される抗体は、細胞障害活性として、例え

ば、補体依存性細胞傷害 (complement-dependent cytotoxicity ; CDC) 活性を有する抗体である。本発明の骨髓腫治療剤の骨髓腫細胞に対するCDC活性は、次のようにして測定することができる。まず標的細胞を適当な培地、例えば10% ウシ胎児血清 (GIBCO-BRL 製) 含有RPMI 1640培地 (GIBCO-BRL 製) で、 4×10^5 個/ml になるよう調製する。標的細胞としては、多発性骨髓腫由来KP MM2 (特開平7-236475)、多発性骨髓腫由来RPMI8226 (ATCC CCL-155)、IgE型骨髓腫由来U266B1 (ATCC TIB-196)、IgG型多発性骨髓腫由来HS-Sultan (ATCC CRL-1484)、形質細胞腫由来ARH-77 (ATCC CRL-1621)、慢性骨髓性白血病由来K562 (ATCC CCL 243)などを用いることができる。

【0044】これら細胞を96穴平底プレート (FALCON 製) に $50\mu\text{l}$ 加え、 37°C CO_2 インキュベーター中で一晩培養する。次いで、CDC活性を測定する抗体を加え、60分間インキュベートした後、適当に希釈した補体、例えばBaby Rabbit Complement (CEDARLANE 製) を加え、2時間インキュベートする。これにAlamar Blue (BIO SOURCE製) を各穴に $10\mu\text{l}$ 加え、4時間インキュベートした後、各穴の蛍光強度 (励起波長530 nm、検出波長590 nm) を蛍光測定システムCytoFluor 2350 (MILLIPORE 製) で測定する。細胞障害活性は(%)は、 $(A-C) / (B-C) \times 100$ で計算することができる。なお、Aは抗体存在下でインキュベートしたときの蛍光強度、Bは抗体を含まず培養液のみでインキュベートしたときの蛍光強度、Cは細胞を含まない穴の蛍光強度である。

【0045】5-2. ADCC活性の測定

本発明に使用される抗体は、細胞障害活性として、例えば、抗体依存性細胞性細胞傷害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ; ADCC) 活性を有する抗体である。本発明の骨髓腫治療剤の骨髓腫細胞に対するADCC活性は、次のようにして測定することができる。まず、ヒトの末梢血や骨髓より比重遠心法で单核球を分離し、エフェクター細胞として調製する。また、標的細胞としては多発性骨髓腫由来KPMM2 (特開平7-236475)、多発性骨髓腫由来RPMI8226 (ATCC CCL-155)、IgE型骨髓腫由来U266B1 (ATCC TIB-196)、IgG型多発性骨髓腫由来HS-Sultan (ATCC CRL-1484)、形質細胞腫由来ARH-77 (ATCC CRL-1621)などを ^{51}Cr により標識して、標的細胞として調製する。次いで、標識した標的細胞にADCC活性を測定する抗体を加えインキュベートし、その後、標的細胞に対し適切な比のエフェクター細胞を加えインキュベートする。

【0046】インキュベートした後上清を取り、ガンマカウンターで放射活性を測定する。その際、最大遊離放射能測定用に、1%のNP-40 を用いることができる。細胞障害活性(%)は、 $(A-C) / (B-C) \times 100$ で計算することができる。なお、Aは抗体存在下において遊離された放射活性 (cpm)、BはNP-40 により遊離された

放射活性 (cpm)、Cは抗体を含まず培養液のみで遊離された放射活性 (cpm) である。

【0047】5-3. 細胞障害活性の増強

ADCC活性やCDC活性のような細胞障害活性を発揮するには、ヒトにおいては抗体定常領域 (C領域) としてC γ 、特にC $\gamma 1$ 又はC $\gamma 3$ を使用することが好ましい。さらに、抗体C領域のアミノ酸を一部付加、改変、修飾することにより、より強力なADCC活性、あるいはCDC活性を誘導することができる。例えば、アミノ酸置換によるIgGのIgM様ポリマー化 (Smith, R. I. F. & Morris, S. L. BIO/TECHNOLOGY (1994) 12, 683-688)、アミノ酸付加によるIgGのIgM様ポリマー化 (Smith, R. I. F. et al., J. Immunology (1995) 154, 2226-2236)、L鎖をコードする遺伝子の直列連結での発現 (Shuford, W. et al., Science (1991) 252, 724-727)、アミノ酸置換によるIgGの二量体化 (Caron, P. C. et al., J. Exp. Med. (1992) 176, 1191-1195、Shopes, B., J. Immunology (1992) 148, 2918-2922)、化学修飾によるIgGの二量体化 (Wolff, E. A. et al., Cancer Res. (1993) 53, 2560-2565)、および抗体ヒンジ領域のアミノ酸改変によるエフェクター機能の導入 (Norderhaug, L. et al., Eur. J. Immunol. (1991) 21, 2379-2384) が挙げられる。これらは、プライマーを利用したオリゴマー部位特異的変異導入法、制限酵素切断部位を利用した塩基配列の付加、共有結合をもたらす化学修飾剤を使用することによって達成される。

【0048】6. 投与経路および製剤

本発明の骨髓腫治療剤は、非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1 Kgあたり0.01 mgから100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1～1000mg、好ましくは5～50 mgの投与量を選ぶことができる。

【0049】本発明の骨髓腫治療剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターーナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられ

る。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。本発明の治療対象疾患としては、標的とする腫瘍細胞上にBST-2 が存在する、骨髄腫である。本発明の治療剤は、骨髄腫の治療剤として有用である。

【0050】

【実施例】次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1. RS38 (IgM型抗BST-2抗体)の作製

1. RS38を含むマウス腹水の作製

RS38産生ハイブリドーマは石川らの方法 (Ishikawara, J. et al., GENOMICS(1995) 26, 527-534) に従い得た。

【0051】あらかじめ14及び4日前に2,6,10,14-テトラメチルペントデカン (和光純薬工業製) をそれぞれ50 μ lずつ腹腔内に投与したBALB/cマウス (日本クレア製) に、本ハイブリドーマ 5×10^6 個を腹腔内に注入した。ハイブリドーマ注入後9日目より、マウスの腹腔内に溜まった腹水を19ゲージの留置針ハッピーキャス (メディキット製) で採取した。採取した腹水は低速遠心機RLX-131 (トミー精工製) を用いて回転数1000及び3000 rpmで2回遠心し、ハイブリドーマ、血球等の雑排物を除去した。

【0052】2. マウス腹水からのRS38の精製

上記マウス腹水からのRS38の精製は以下の方法で行った。マウス腹水に等量のPBS(-)を加えた後、中空糸フィルターメディアプレッパ (MILLIPORE 製) を用いてろ過した後、高速抗体精製装置ConSep LC100 (MILLIPORE 製) および抗マウスIgG+IgM 抗体結合カラム (カラム体積 20 ml、日本ガイシ製) を用い、付属の説明書に基づき吸着緩衝液として0.02M リン酸緩衝液 (pH7.6) 、洗浄液としてWashバッファー-A (日本ガイシ製) 、溶出緩衝液として0.2 M グリシン- 塩酸緩衝液 (pH 2.5) を用いてアフィニティー精製した。

【0053】溶出画分は直ちに1 M Tris-HCl (pH 8.0) を添加してpH7.4付近に調整した後、遠心限外濃縮器Centriprep 10 を用いて濃縮およびPBS(-)への緩衝液置換を行い、孔径0.22 μ m のメンブランフィルター-MILLEX-G V (MILLIPORE 製) でろ過滅菌し、精製RS38を得た。

3. 抗体濃度の測定

精製抗体の濃度測定は吸光度の測定により行った。すなわち、精製抗体をPBS(-)で希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出した。

【0054】実施例2. RS38-E (IgG型抗BST-2抗体)の作製

1. RS38-Eを含むマウス腹水の作製

RS38-E産生ハイブリドーマは石川らの方法 (Ishikawara, J. et al., GENOMICS (1995) 26, 527-534) に従い得た。上記実施例1-1 に従い、RS38-Eを含むマウス腹水

を得た。

【0055】2. マウス腹水からのRS38-Eの精製

上記マウス腹水からのRS38-Eの精製は以下の方法で行った。マウス腹水に等量のPBS(-)を加えた後、中空糸フィルターメディアプレッパ (MILLIPORE 製) を用いてろ過した後、高速抗体精製装置ConSep LC100 (MILLIPORE 製) およびHyperD Protein A カラム (カラム体積 20 ml 1. 日本ガイシ製) を用い、付属の説明書に基づき吸着緩衝液として1.5Mグリシン+3M 塩化ナトリウム緩衝液 (pH8.9) 、溶出緩衝液として0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6) を用いてアフィニティー精製した。

【0056】溶出画分は直ちに1 M Tris-HCl (pH 8.0) を添加してpH7.4 付近に調整した後、遠心限外濃縮器Centriprep 10 を用いて濃縮およびPBS(-)への緩衝液置換を行い、孔径0.22 μ m のメンブランフィルター-MILLEX-G V (MILLIPORE 製) でろ過滅菌し、精製RS38-Eを得た。精製抗体の濃度測定は上記実施例1-3 に従った。

【0057】実施例3. 抗BST-2抗体の骨髄腫細胞に対する反応性の検討

1. コントロールマウスIgG1(MOPC-31C)の作製および精製

コントロールマウスIgG1(MOPC-31C)の作製および精製は以下の方法で行った。1-a. MOPC-31C を含むマウス腹水の作製

MOPC-31C産生ハイブリドーマ(ATCC CCL 130)を上記実施例1-1 に従い、BALB/cマウスの腹腔内に注入し、MOPC-31Cを含むマウス腹水を得た。

1-b. マウス腹水からのMOPC-31Cの精製

上記マウス腹水からのMOPC-31Cの精製は上記実施例2-2 に従った。精製抗体の濃度測定は上記実施例1-3 に従った

【0058】2. FCM 解析

抗BST-2 抗体の骨髄腫細胞に対する反応性の検討は、FCM (フローサイトメトリー) 解析で行った。多発性骨髄腫由来KPMM2 (特開平7-236475) 、IgG 型形質細胞腫由来ARH-77 (ATCC CRL-1621) 、多発性骨髄腫由来RPMI8226 (ATCC CCL-155) 、IgE 型骨髄腫由来U266B1 (ATCC TIB-196) 、IgG 型多発性骨髄腫由来HS-Sultan (ATCC CRL-1484) 、慢性骨髄性白血病由来K562 (ATCC CCL 243) をPBS(-)で洗浄した後、FACS 緩衝液 (2 %ウシ胎児血清、0.05%アジ化ナトリウム含有 PBS(-)) で25 μ g/ml に希釈したRS38-EあるいはMOPC-31C 100 μ l を加え、氷温化30分インキュベートした。

【0059】FACS 緩衝液で洗浄した後、25 μ g/mlのFITC標識ヤギ抗マウス抗体 (GAM) 100 μ l を加え、氷温化30分間インキュベートした。FACS 緩衝液で洗浄した後、600 μ l のFACS 緩衝液に懸濁し、FACScan (Becton Dickinson社製) で各細胞の蛍光強度を測定した。その結果、図1に示すように、骨髄腫細胞株では全例でRS38-Eと強く反応し、細胞上にBST-2 を高発現しているこ

とが確認された。一方、非骨髓腫細胞株であるK562はRS38-Eとほとんど反応せず、細胞表面のBST-2の発現がないか、あるいは非常に弱いものと思われた。

【0060】実施例4. ノザンプロット解析

細胞内のBST-2のmRNAの発現を調べるためにノザンプロット解析は、以下のように行った。

1. Total RNAの調製

多発性骨髓腫由来KPMM2（特開平7-236475）、多発性骨髓腫由来RPMI8226（ATCC CCL-155）、IgE型骨髓腫由来U266B1（ATCC TIB-196）、慢性骨髓性白血病由来K562（ATCC CCL 243）各々 1.0×10^7 個をPBS(-)で洗浄した後、TRIzol（GIBCO-BRL製）1mlを加え溶解した。これにクロロホルム200μlを加え、攪拌後冷却高速遠心機MRX-152（トミー精工製）を用いて14000 rpmで15分間遠心し、上層を回収した。

【0061】これにイソプロパノール500μlを加え、軽く攪拌後同様に15000 rpmで10分間遠心した後、沈殿を70%エタノールで洗浄した。減圧乾燥後、DEPC処理水に溶解させ、全RNAを得た。RNA濃度については、一部をさらにDEPC処理水で希釈し波長260 nmの吸光度をスペクトロフォトメーターDU 650（BECKMAN製）を用いて測定し、RNA濃度を算出した。

【0062】2. ノザンハイブリダイゼイション

上記1で得た全RNAを $20 \mu\text{g}/\text{レーン}$ となるようにホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルにアプライし、100Vにて電気泳動を行った。電気泳動後、アガロースゲルからRNAをナイロンメンブランハイボンドN（Amersham製）にキャピラリートランスファーにより転写した。転写後、ナイロンメンブランをRapid Hybridization buffer（Amersham製）で68°Cで15分間プレハイブリダイゼイションした後、BST-2のcDNAをクローニングしたプラスミドpUC-HM(315)のHind III断片(315bp)またはEcoRI-Not I断片(約900bp)を鋳型としてrandom prime DNA labelling system（Amersham製）により ^{32}P 標識したプローブDNAを加え、68°Cで2時間ハイブリダイゼイションした。

【0063】ナイロンメンブランを0.1%SDS含有2xSSC溶液、0.1%SDS含有0.2xSSC溶液でそれぞれ2回ずつ洗浄した後、BAS-5000（富士フィルム製）にてBST-2 mRNAの検出を行った。その結果、図7に示す通り、K562ではBST-2 mRNAの発現が弱いのに比較して、KPMM2、RPMI8226、U266B1ではいずれもBST-2 mRNAのバンドが強く、これら骨髓腫細胞株ではBST-2 mRNAが強く発現していることが明らかとなった。

【0064】実施例5. CDC活性の測定

抗BST-2抗体の、骨髓腫細胞に対するCDC活性は、以下のようにして測定した。

1. 標的細胞の調製

標的細胞として多発性骨髓腫由来RPMI8226（ATCC CCL-155）、IgE型骨髓腫由来U266B1（ATCC TIB-196）、IgG

型多発性骨髓腫由来HS-Sultan（ATCC CRL-1484）、慢性骨髓性白血病由来K562（ATCC CCL 243）を、10%ウシ胎児血清（GIBCO製）含有RPMI 1640培地（GIBCO製）で 4×10^6 個/mlになるように調製した。これら細胞懸濁液を96穴平底プレート（FALCON製）に $50 \mu\text{l}$ 加え、37°C、5%CO₂高温インキュベーター（TABAI製）中で一晩培養した。

【0065】2. RS38の調製

前記実施例1で得られた精製RS38を、10%ウシ胎児血清（GIBCO-BRL製）含有RPMI 1640培地（GIBCO-BRL製）で0、0.2、2及び $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製し、上記1で作製した96穴平底プレートの各穴に $50 \mu\text{l}$ ずつ加えた。37°C、5%CO₂高温インキュベーター（TABAI製）中で60分間インキュベートした後、低速遠心機05PR-22（日立製）を用いて、1000 rpm、5分間遠心し、上清 $50 \mu\text{l}$ を除去した。

3. 補体の調製

Baby Rabbit Complement（CEDARLANE製）を1バイアルあたり1mlの精製水で溶解し、さらにFCS不含RPMI 1640培地（GIBCO製）5mlで希釈した。これを上記2の96穴平底プレートの各穴に $50 \mu\text{l}$ 添加し、37°C、5%CO₂高温インキュベーター（TABAI製）中で2時間インキュベートした。

【0066】4. CDC活性の測定

インキュベート後、上記3の96穴平底プレートの各穴にAlamar Blue（BIO SOURCE製）を $10 \mu\text{l}$ ずつ加え、37°C、5%CO₂高温インキュベーター（TABAI製）中で4時間インキュベートした後、各穴の蛍光強度（励起波長530 nm、検出波長590 nm）を蛍光測定システムCytoFluor 2350（MILLIPORE製）で測定した。細胞障害活性（%）は、(A-C)/(B-C) × 100で計算した。なお、Aは抗体存在下でインキュベートしたときの蛍光強度、Bは抗体を含まず培養液のみでインキュベートしたときの蛍光強度、Cは細胞を含まない穴の蛍光強度である。

【0067】その結果、図8に示すように、FCM解析でRS38-Eとの反応が弱く、さらにノザンプロット解析でもBST-2のmRNAの発現が比較的弱かったK562では、RS38を添加しても細胞障害が起きなかつたのに対し、FCM解析でRS38-Eと強く反応し、BST-2のmRNAの発現も強いRPMI8226、U266B1、HS-Sultanでは、いずれも添加したRS38の濃度依存的に細胞障害が見られた。このことから、抗BST-2抗体は、細胞表面にBST-2を高発現している骨髓腫細胞に対して、CDC活性を示すことが明らかとなった。

【0068】

【発明の効果】抗BST-2抗体の処理により、骨髓腫細胞においてCDCによる細胞障害が認められた。このことから、抗BST-2抗体は骨髓腫細胞に対し、抗腫瘍効果を有することが示される。

[0069]

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ : 1013

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

配列0

GGATTCGGCA CGAGGGATCT GG ATG GCA TCT ACT TCG TAT GAC TAT TGC AGA	52
Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg	
1 5 10	
GTG CCC ATG GAA GAC GGG GAT AAG CGC TGT AAG CTT CTG CTG GGG ATA	100
Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile	
15 20 25	
GGA ATT CTG GTG CTC CTG ATC ATC GTG ATT CTG GGG GTG CCC TTG ATT	148
Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile	
30 35 40	
ATC TTC ACC ATC AAG GCC AAC AGC GAG GCC TGC CGG GAC GGC CTT CGG	196
Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg	
45 50 55	
GCA GTG ATG GAG TGT CGC AAT GTC ACC CAT CTC CTG CAA CAA GAG CTG	244
Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu	
60 65 70	
ACC GAG GCC CAG AAG GGC TTT CAG GAT GTG GAG GCC CAG GCC ACC	292
Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr	
75 80 85 90	
TGC AAC CAC ACT GTG ATG GCC CTA ATG GCT TCC CTG GAT GCA GAG AAG	340
Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys	
95 100 105	
GCC CAA GGA CAA AAG AAA GTG GAG GAG CTT GAG GGA GAG ATC ACT ACA	388
Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr	
110 115 120	
TTA AAC CAT AAG CTT CAG GAC GCG TCT GCA GAG GTG GAG CGA CTG AGA	436
Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg	
125 130 135	
AGA GAA AAC CAG GTC TTA AGC GTG AGA ATC GCG GAC AAG AAG TAC TAC	484
Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr	
140 145 150	
CCC AGC TCC CAG GAC TCC AGC TCC GCT GCG GCG CCC CAG CTG CTG ATT	532
Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile	
155 160 165 170	
GTG CTG CTG GGC CTC AGC GCT CTG CTG CAG TGAGATCCCA GGAAGCTGGC	582
Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln	
175 180	
ACATCTTGGAA AGGTCCGTCC TGCTGGCTT TTGCTTGAAG CATTCCCTTG ATCTCATCAG	642
TTCTGAGCGG GTCATGGGGC AACACGGTTA GCGGGGAGAG CACGGGGTAG CGGGAGAAGG	702
GCCTCTGGAG CAGGCTCTGGA GGGGCCATGG GGCAGTCTG GGTGTGGGG CAACAGTCGGG	762
TTGACCCAGG GCTGTCCTCC TCCAGAGCCT CCCTCCGGAC AATGAGTCCC CCCTCTGTGTC	822
TCCCACCTTG AGATTGGGCA TGGGGTGGGG TGTTGGGGC ATGTGCTGCC TGTTGTATG	882
GGTTTTTTTT GCGGGGGGGG TTGCTTTTT CTGGGGTCTT TGAGCTCCAA AAAAATAAAC	942
ACTTCCTTGTG AGGGAGAGCA CACCTAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAATTG	1002
GGGGCGGCCG C	1013

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、RS38-EおよびコントロールマウスIgG1

(MOPC-31C) で、間接法によりKPMM2をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

【図2】図2は、RS38-EおよびコントロールマウスIgG1(MOPC-31C)で、間接法によりARH-77をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

【図3】図3は、RS38-EおよびコントロールマウスIgG1(MOPC-31C)で、間接法によりRPMI8226をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

【図4】図4は、RS38-EおよびコントロールマウスIgG1(MOPC-31C)で、間接法によりU266B1をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

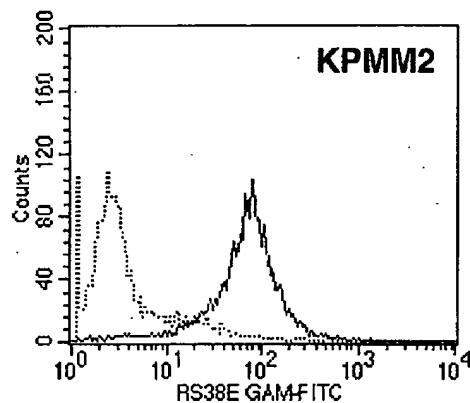
【図5】図5は、RS38-EおよびコントロールマウスIgG1(MOPC-31C)で、間接法によりHS-SultanをFCM解析したときのヒストグラムを示す。

【図6】図6は、RS38-EおよびコントロールマウスIgG1(MOPC-31C)で、間接法によりK562をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

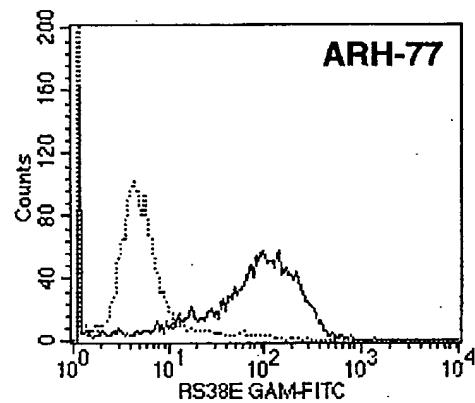
【図7】図7は、BST-2に対するプローブを用いてノザンプロットを行ったときのオートラジオグラフィーであり、K562ではBST-2 mRNAの発現が弱いのに対し、KPMM2、RPMI8226、U266B1ではいずれもBST-2 mRNAの発現が強いことを示す。

【図8】図8は、RS38がK562に対しては細胞障害活性を示さないのに対し、骨髄腫細胞株であるRPMI8226、U266B1、HS-Sultanに対しては、濃度依存的にCDC活性による細胞障害を引き起こしていることを示すグラフである。

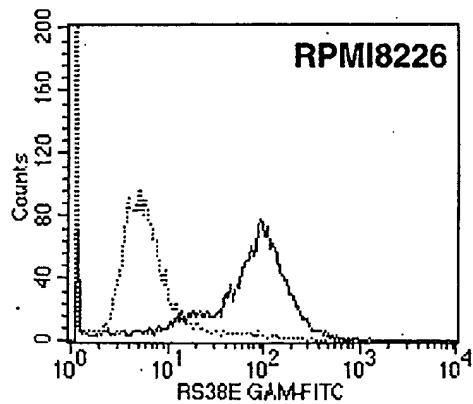
【図1】



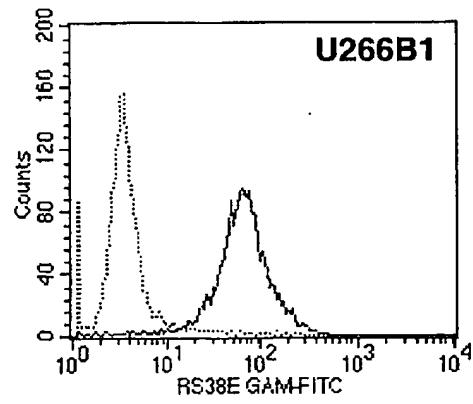
【図2】



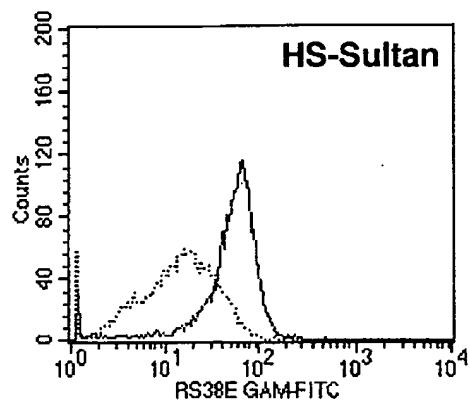
【図3】



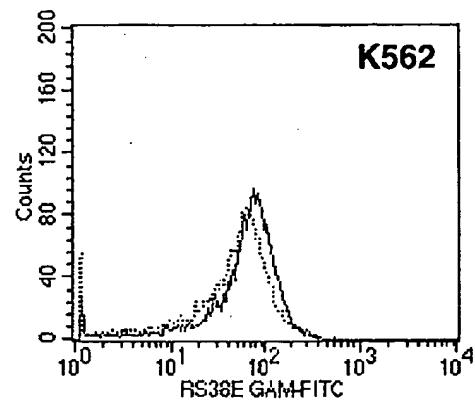
【図4】



【図5】

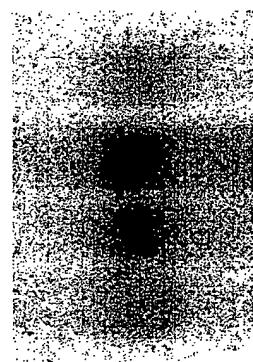


【図6】



【図7】

a



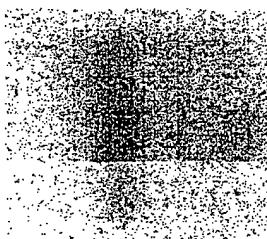
K562

U266B1

RPMI8226

ARH-77

b



【図8】

